

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biochemie

Studijní obor:

Biochemie



Václav Havelka

Příprava mutantů enzymu methioninsulfoxidreduktasy a jejich využití
pro přípravu chirálních sulfoxidů

Preparation of a Library of Methionine Sulfoxide Reductase for Applications in
Synthesis of Chiral Sulfoxides

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Jiří Míšek, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci

vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Míška, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Podpis:

Abstrakt

Chirální sulfoxidy jsou důležité sloučeniny ve farmaceutickém a chemickém průmyslu, nicméně jejich enantioselektivní syntéza poskytující pouze jeden žádaný enantiomer není zcela zvládnuta. Některé přirozené enzymy mohou být využity pro biokatalytickou přípravu chirálních sulfoxidů. Jedním z takových enzymů je methioninsulfoxidreduktasa. Methioninsulfoxidreduktasa je enzym omezující následky reaktivních kyslíkových radikálů v organismu vznikajících v důsledku kyslíkového metabolismu. Její funkce je redukce methioninsulfoxidu v proteinech na methionin. Existují dva typy methioninsulfoxidreduktas, methioninsulfoxidreduktasa A redukující pouze (*S*)-methioninsulfoxid a methioninsulfoxidreduktasa B redukující (*R*)-methioninsulfoxid. Methioninsulfoxidreduktasa B je vhodná k přípravě (*S*)-sulfoxidů, nicméně její katalytická aktivita není dostatečná pro praktické využití. Využitím technik rekombinantní DNA a mutagenní PCR byla připravena knihovna mutantů methioninsulfoxidreduktasy B a byla určena míra a charakter zavedených mutací. Tato knihovna bude sloužit jako výchozí bod pro řízenou evoluci enzymu pro získání klonů se zvýšenou aktivitou a sníženou substrátovou specifitou.

Klíčová slova: mutagenní PCR, klonování, sekvenace DNA

Abstract

Chiral sulfoxides are important compounds in the pharmaceutical and chemical industries, however, their enantioselective synthesis providing only one desired enantiomer is not fully mastered. Some natural enzymes can be used for the biocatalytic preparation of chiral sulfoxides. One of such enzymes is methionine sulfoxide reductase. Methionine sulfoxide reductase is an enzyme limiting the effects of reactive oxygen radicals in the organism resulting from oxygen metabolism. Its function is the reduction of methionine sulfoxide in proteins to methionine. There are two types of methionine sulfoxide reductase, methionine sulfoxide reductase A reducing only (*S*)-methionine sulfoxide and methionine sulfoxide reductase B reducing (*R*)-methionine sulfoxide. Methionine sulfoxide reductase B is suitable for the preparation of (*S*) - sulfoxides, however its catalytic activity is not sufficient for practical use. Using the recombinant DNA and mutagenic PCR techniques, a methionine sulfoxide reductase B mutant library was prepared, and the extent and nature of mutation introduced was determined. This library will serve as a starting point for the controlled evolution of the enzyme to obtain clones with increased activity and reduced substrate specificity.

Key words: mutagenic PCR, cloning, DNA sequencing

(In Czech)

Obsah

Abstrakt

Abstract

Seznam zkratk	1
Úvod.....	2
Rekombinantní proteiny	2
Biokatalýza	2
Chirální sulfoxidy	3
Léčiva s chirálními sulfoxidy a jejich syntéza.....	5
Methioninsulfoxidreduktasa	6
Thioredoxin.....	7
Fluorescentní sonda pro sledování aktivity Msr	7
Využití Msr pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů	8
Cíle práce	10
Metody a materiál	11
Materiál a přístroje.....	11
Přístroje a pomůcky	11
Materiál a chemikálie.....	11
Mutagenní PCR.....	13
Provedení	15
Agarosová elektroforéza	16
Provedení	16
Restrikce plazmidu	17
Provedení	18
Izolace insert a vektor DNA z gelu.....	19
Restrikce insertu	20

Ligace insertu do vektoru	20
Provedení	20
Příprava LB agarových ploten	21
Provedení	21
Transformace chemicky kompetentních buněk	21
Provedení	23
Izolace DNA z buněk.....	23
Provedení	23
Výsledky	25
Diskuze	31
Závěr	32
Seznam zdrojů.....	33

Seznam zkratk

A- adenin

bp- párů bází (z angl. base pairs)

C- cytosin

dNTPs- dexoyribonukleotidy

FS- filtračně sterilizované

G- guanin

kbp- tisíce páru bází (z angl. kilobase pairs)

LB- Luria-Bertani medium

MCS- klonovací místo (z angl. multiple cloning site)

MsrA- methioninsulfoxidreduktasa A

MsrB- methioninsulfoxidreduktasa B

Msr- methioninsulfoxidreduktasy

PCR- polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

pilB- methioninsulfoxidreduktasa A a B z organismu *Neisseria gonorrhoeae*

RE- restriční endokleasa/-asy

ROS- reaktivní kyslíkové částice (z angl. reactive oxygen species)

RPM- rotace za minutu (z angl. rotations per minute)

T- thymin

WT- přirozená (z angl. wild type)

Úvod

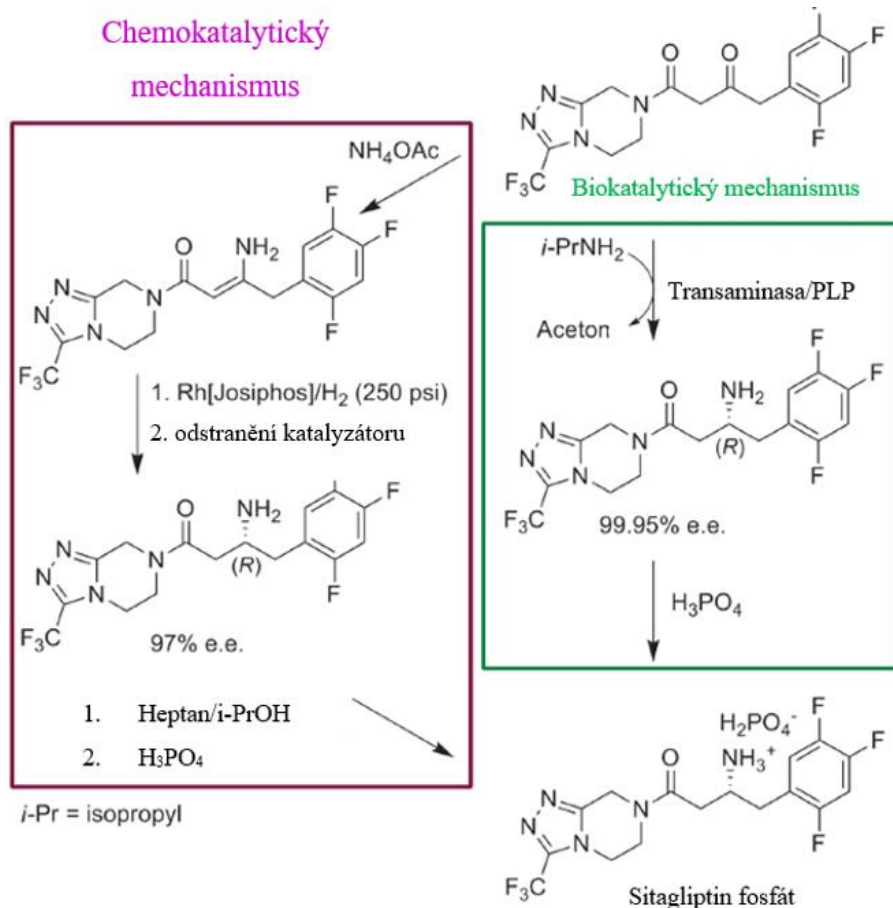
Rekombinantní proteiny

Rekombinantní DNA jsou uměle tvořené molekuly DNA, které přináší možnost manipulace s genomem. Vnášené sekvence DNA mohou být získávány z různorodých organismů. Cílem přípravy rekombinantní DNA je exprese rekombinantního proteinu v hostitelském organismu. Příprava rekombinantní DNA poskytuje možnosti využití v biotechnologiích, medicíně a výzkumu. Geneticky modifikované organismy poté mohou exprimovat enzymy, hormony a další látky, jejichž izolace v dostatečné koncentraci z přírodních zdrojů je velmi náročná¹. Příprava rekombinantních DNA poskytuje možnost vnést strukturní změny do exprimovaného rekombinantního enzymu a tím ovlivnit vlastnosti. Takto lze ovlivnit substrátovou specifitu nebo katalytickou aktivitu enzymů².

Biokatalýza

Principem biokatalýzy je využití enzymů v průběhu organické syntézy. Organická syntéza je odvětví, které hledá stále nové cesty pro syntézu molekul pro farmaceutickém a chemickém průmyslu. Klíčová pro syntézu je selektivita chemických reakcí, která umožňuje vznik žádaného produktu ve vysokém výtěžku. Řada chemických reakcí potřebuje být katalyzovaná. K této katalýze mohou být využity kyseliny, báze, různé organické molekuly, ionty kovů, anebo právě enzymy. Úskalím neenzymatických katalyzátorů je, že při chemických reakcích, kde na některém z atomů vzniká stereogenní centrum, není jednoduché připravit pouze jeden enantiomer. Enzymy však poskytují velkou výhodu ve své selektivitě. Selektivita znamená, že vznikají stereoizomery v nerovnovážném poměru ve prospěch z jednoho z izomerů. Další z výhod biokatalýzy je, že enzymové reakce probíhají za mírných podmínek, tudíž použití enzymů zlevňuje syntézu³. Nicméně vysoká substrátová specifita je často problémem u enzymů, která brání jejich širšímu využití. S rozvojem technik přípravy rekombinantních DNA je možné ovlivnit substrátovou specifitu a rychlost enzymových reakcí. Jedním z takových příkladů využití rekombinantního enzymu je enantioselektivní syntéza sitagliptinu využívaného jako léčivo proti hyperglykémii (Obr.1)⁴. V procesu syntézy tohoto léčiva bylo dříve využívána asymetrická hydrogenace enaminu za vysokého tlaku vodíku na katalyzátoru založeném na rhodiu. Řízenou mutagenezí však byla ovlivněna substrátová specifita

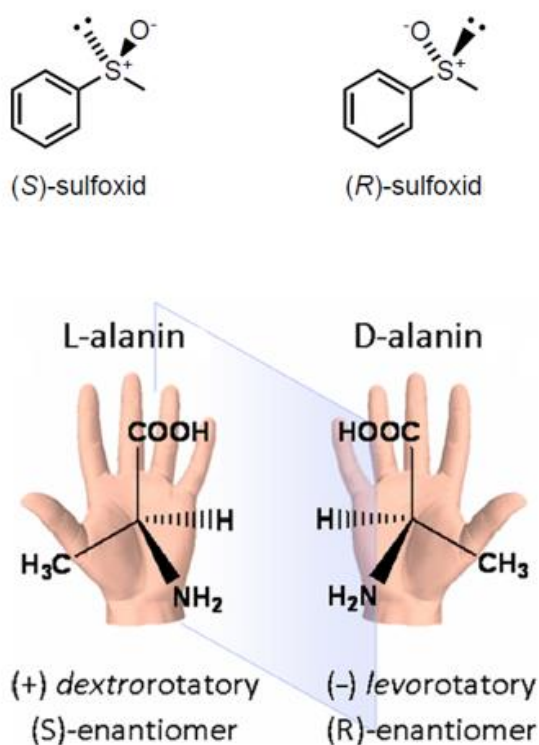
jedné z transaminas. Byla vybrána (*R*)-selektivní transaminasa enzymu z druhu *Arthrobacter*, do které byly zaneseny mutace a bylo pozorováno ovlivnění enzymové aktivity v důsledku snížení substrátové specifity⁵. Vývoj vhodného biokatalytického systému v tomto případě výrazně zjednodušil a zlevnil syntézu léčiva, neboť probíhá za atmosférického tlaku a nepotřebuje drahý katalyzátor na bázi rhodia.



Obr. 1: Porovnání chemokatalytického a biokatalytického mechanismu syntézy sitagliptinu. Výhodou biokatalytického mechanismu je, že probíhá za mírnějších podmínek a nepotřebuje ke svému průběhu nákladné katalyzátory⁵.

Chirální sulfoxidy

Atom síry v sulfoxidech může být stereogenním centrem pokud nese síra dva různé uhlíkové substituenty (Obr. 2). Podle postavení substituentů na atomu síry se rozlišují dva enantiomery (*R*) a (*S*). Enantiomery mají fyzikálně chemické vlastnosti stejné, ale mohou se lišit vlastnostmi biologickými. Konfigurace ovlivňuje například aktivitu léčiv v organismu. Důvodem pro rozdílnou biologickou aktivitu je, že receptory a aktivní místa enzymů v organismech jsou chirální a rozlišují mezi enantiomery^{6,7}.

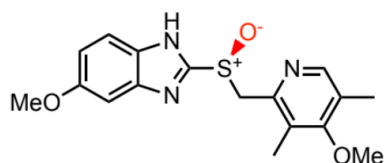


Obr. 2: Porovnání geometrických struktur dvou enantiomerů sulfoxidu s enantiomery alaninu. Enantiomery tvoří neztotožnitelný zrcadlový obraz⁷.

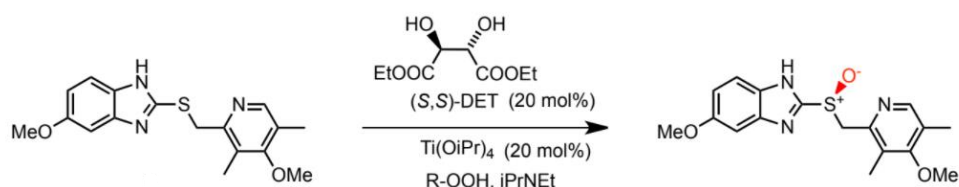
Chirální sulfoxidy jsou velice důležité v mnoha odvětvích chemického průmyslu, včetně vývoje nových léčiv, funkčních materiálů či syntetických reagentů. Velmi často je nutné získat pouze jeden enantiomer. Enantioselektivní syntéza znamená sled reakcí, při kterém vznikající produkt o určité chiralitě vzniká v nadbytku oproti druhému enantiomeru⁸. Do současnosti byla vyvinuta řada chemických metod pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů probíhající nejčastěji jako enantioselektivní sulfoxidace. Typickým příkladem je Kaganova metoda využívající titaničitý katalyzátor s chirálním ligandem (Obr. 4). Od té doby zaznamenala chemie vyšší zájem o chirální sulfoxidy především v enantioselektivní syntéze a vývoji léčiv^{6,9}. Řada dalších enantioselektivních sulfoxidačních metod byla vyvinuta, avšak obecných metod poskytujících pouze jeden enantiomer s vysokou selektivitou je málo. Využití enzymu pro enantioselektivní přípravu chirálních sulfoxidů je slibná oblast enantioselektivní katalýzy.

Léčiva s chirálními sulfoxidy a jejich syntéza

Jedním z příkladů využití pouze jednoho enantiomeru sulfoxidu je léčivo s účinnou látkou Esomeprazol (Obr. 3). Léčivo využívané pro léčbu žaludečních vředů a gastrofazoegálního refluxu-pálení žáhy¹⁰.

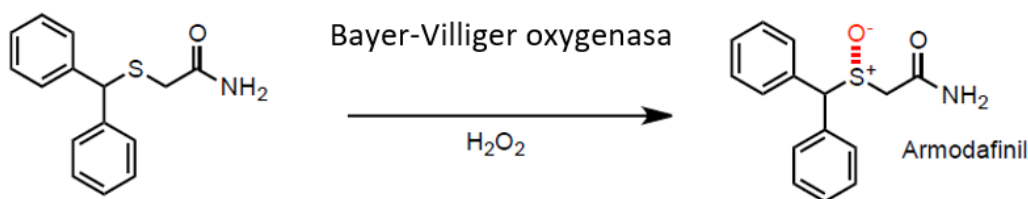


Obr. 3: Struktura látky Esomeprazol využívané jako léčivo žaludečních obtíží¹¹.



Obr. 4: Příklad průmyslové syntézy látky Esomeprazol¹¹.

Jsou už však i léčiva, kde se biokatalytický systém při syntéze využívá. Jedním z nich je Armodafinil, což je pouze (*R*)-izomer léčiva s účinnou látkou modafinil (Obr. 5). Tyto látky jsou používány pro léčbu poruch spánku¹².

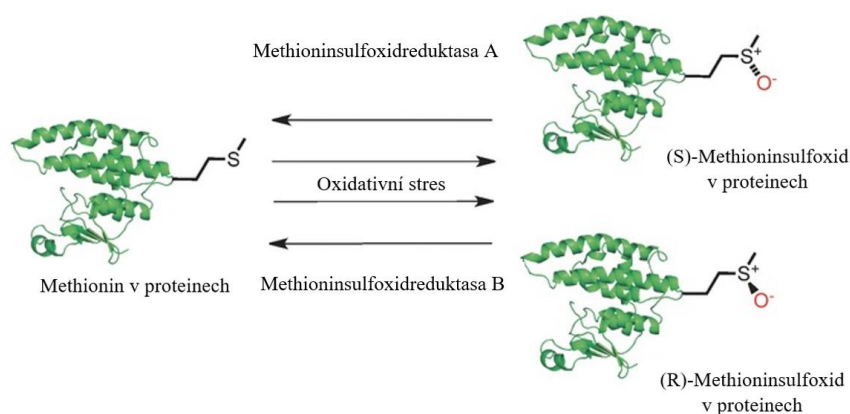


Obr. 5: Biokatalytická syntéza léčiva Armodafinil obsahujícího ve své struktuře sulfoxid¹³.

Methioninsulfoxidreduktasa

Methionin je aminokyselina náchylná k oxidaci. Při oxidaci methioninu v proteinech vzniká methioninsulfoxid, což je derivát aminokyseliny, který je polárnější a více interaguje s polárním rozpouštědlem, což může vést k denaturaci a k inaktivaci funkcí proteinů¹⁴. Existuje třída oxidoreduktas nazvané methioninsulfoxidreduktasy, které používají jako substrát proteinově vázaný methioninsulfoxid. Tato třída enzymů je velmi důležitá a její výskyt je konzervovaným jevem napříč mnoha organismy¹⁵. V oxidovaném stavu se vyskytuje substrát jako methioninsulfoxid a enzym ho redukuje na methionin. Díky katalýze této reakce enzymy omezují následky oxidativního stresu v organismu. Zvýšená koncentrace reaktivních kyslíkových částic (ROS) je hlavním původcem oxidativního stresu v organismu. V organismu se může vyskytnout více typů ROS, které jsou produkovány z molekulárního kyslíku. Hlavními zástupci ROS v organismu jsou superoxidový anion O_2^- , hydroxylový radikál $\bullet OH$ a peroxid vodíku H_2O_2 ¹⁶. ROS vznikají v živých organismech jako důsledek normálního metabolismu. Pokud v těle oxidativní stres přetrvává, můžou v těle nastávat patologické podmínky a vznikat nemoci. Proto si aerobní organismy vyvinuly mechanismy, které jsou schopné omezit oxidativní stres v těle. Tyto antioxidační systémy zahrnují jak enzymové, tak neenzymové mechanismy a jsou schopné efektivně snížit koncentraci ROS v organismu¹⁶.

Při oxidaci methioninu mohou vznikat dva enantiomerní sulfoxidy. Methioninsulfoxidreduktasy jsou v těle proto dvojího druhu. Tyto druhy se liší tím, jaký substrát redukují. Methioninsulfoxidreduktasa A (MsrA) je selektivní pro substrát (*S*)-methioninsulfoxid a pro methioninsulfoxidreduktasu B (MsrB) je substrátem (*R*)-methioninsulfoxid (Obr. 6). Důležitost této třídy enzymů byla dokázána na řadě organismů¹⁵. Zajímavým poznatkem bylo, že u druhu *Drosophila* zvýšená exprese enzymu MsrA způsobila téměř zdvojnásobení délky života¹⁵. Při zvýšené expresi enzymu MsrB nedochází ke změně délky života¹⁷.

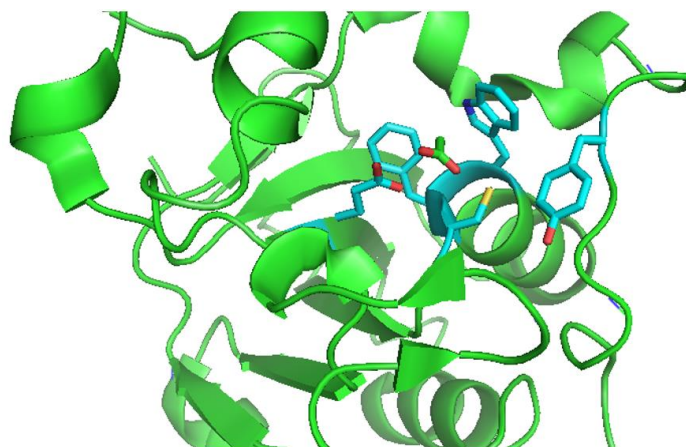


Obr. 6: Schéma katalytické činnosti enzymů methioninsulfoxidreduktas.

Oxidací atomu síry na methioninu vzniká jak (*S*)-methioninsulfoxid, který redukuje MsrA, tak (*R*)-methioninsulfoxid, který redukuje MsrB¹⁵.

Thioredoxin

Methioninsulfoxidreduktasy (Msr) jsou oxidoreduktasy mající aktivní cystein v katalytické místě, který je nezbytný pro aktivitu (Obr. 7)¹⁸. Msr jsou tudíž enzymy závislé na thioredoxinu¹⁹. Thioredoxiny mají v aktivním místě dva cysteiny a jsou hlavními buněčnými disulfidovými reduktasami. Slouží jako elektronové donory pro řadu různých enzymů, mezi nimiž jsou i methioninsulfoxidreduktasy²⁰.

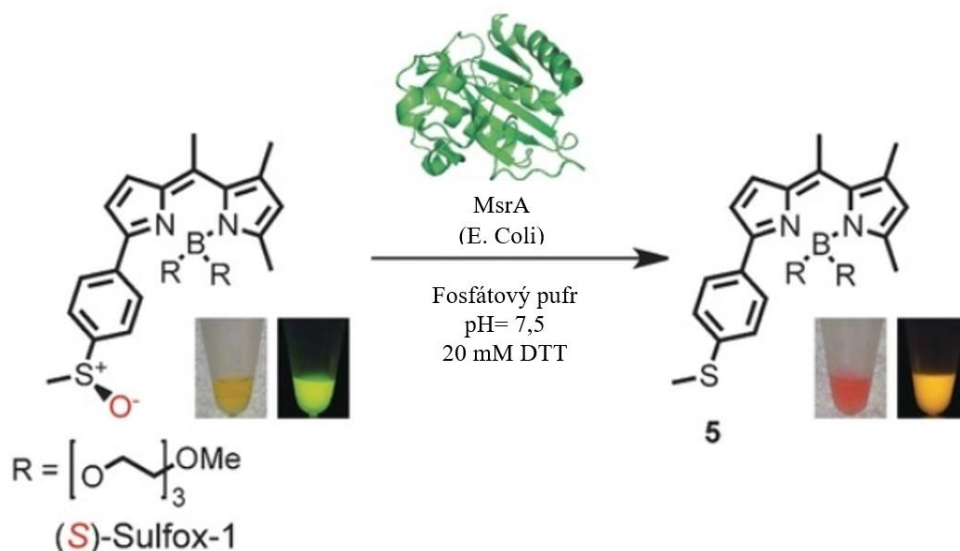


Obr. 7: Struktura aktivního místa MsrA z *E. coli*. Zobrazený vedlejší řetězec cysteinu je nezbytný pro katalytickou aktivitu.

Fluorescentní sonda pro sledování aktivity Msr

Pro sledování aktivity Msr byla vyvinuta sonda schopná vykazat barevnou změnu v závislosti na redoxním stavu. Tato sonda lze použít jako substrát pro Msr. Jak je vidět

na obrázku 8, po redukci sulfoxidu dochází k bathochromnímu posunu. Sondu je možné použít jak při studiu *in vitro*, tak především *in vivo* například v bakteriích. Sonda může mít buď (*R*)-izomer, nebo (*S*)-izomer sulfoxidu, tudíž je s ní možné pozorovat aktivitu jak MsrA, tak MsrB¹⁵.

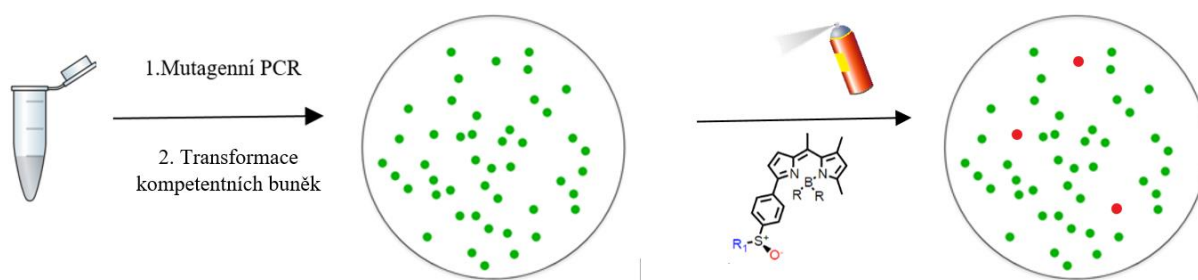


Obr. 8: Molekulární mechanismus barevného posunu redukované a oxidované formy fluorescentní sondy Sulfox-1¹⁵.

Využití Msr pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů

Tato bakalářská práce je součástí širšího projektu, jež má za cíl využití Msr pro enantioselektivní syntézu chirálních sulfoxidů. Jednou z překážek je vysoká substrátová specifita umožňující enantioselektivní redukci pouze methylsulfoxidů. Další nevýhodou je obecně nízká katalytická aktivita u (*R*)-selektivní MsrB. Cílem projektu je vyvinutí robustní a jednoduché metody pro evoluci těchto enzymů a získání variant enzymů využitelných pro praktickou přípravu chirálních sulfoxidů. Schéma metody pro takovouto metodu je znázorněno v Obr. 9.

Technikami přípravy rekombinantní DNA je získána DNA s mutacemi, která je po transformaci kompetentními buňkami exprimována a následně je na Petriho misku aplikován roztok sondy Sulfox-1 (Obr. 9). Tato sonda může na pozici (R_1 -) různé substituenty a slouží tak k pozorování substrátové specifity.



Obr. 9- Schéma metody pro řízenou evoluci Msr.

Cíle práce

Tato práce je řešena v širším kontextu projektu, který je popsán v předešlé kapitole (úvod). Cílem této práce je příprava knihovny mutantů enzymu methioninsulfoxidreduktasy B z organismu *Neisseria gonorrhoeae* a určení míry a charakteru mutací. Knihovna mutantů je získána zanesením náhodných mutací do sekvence přirozené MsrB pomocí PCR, přípravou rekombinantní DNA, transformace kompetentních buněk a následnou sekvenací. Příprava klonů mutantů enzymu je nezbytným krokem k přípravě takových rekombinantních enzymů, které budou mít vyšší efektivitu, či nižší substrátovou specifitu. Tyto knihovny budou dále pro získání enzymu využitelného při enantioselektivní syntéze chirálních sulfoxidů.

Metody a materiál

Materiál a přístroje

Přístroje a pomůcky

<u>Název</u>	<u>Výrobce</u>
Mikrovlnný autokláv MICROJET ML2	ENBIO Technology Sp. Z o. o
Zdroj pro elektroforézu PowerPac HV Power Supply + vanička pro DNA elektroforézu	BioRad
Centrifuga 5418 R	Eppendorf AG
UV transiluminátor T-GENIUS	SYNGENE
PCR termocyklovač Aeri D-48x0,2ml	Esco Micro Pte Ltd
Inkubovaná třepačka s chlazením TS-100C	Biosan
Třepačka s inkubátorem IKA KS 4000 i control	IKA® Works, Inc.
Mikrovlnná trouba	
Předvážky AQT-600	AE ADAM
Analytické váhy	Schoeller
Automatické pipety Research plus	Eppendorf AG
Prosvěcovací pult Safe Imager	Invitrogen
Magnetická míchačka s podložkou	

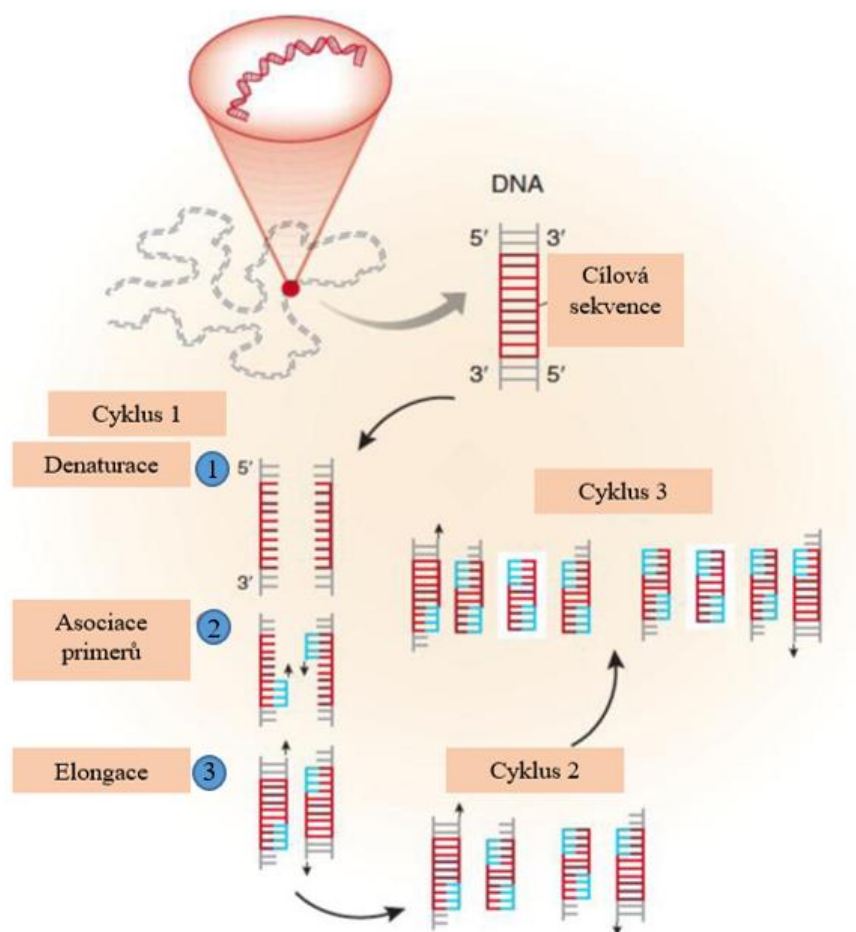
Materiál a chemikálie

<u>Název</u>	<u>Výrobce</u>
Aurum Plasmid Mini Kit	BioRad
XL-10 Gold ultrakompetentní buňky	Agilent Technologies
Gel Extraction Kit	PEQLAB
GeneMorph II Random Mutagenesis kit včetně roztoku β -merkaptioethanolu	Agilent Technologies
10 \times TBE pufr	BioRad
100 bp marker pro agarózovou elektroforézu	BioRad
1 kbp marker pro agarózovou elektroforézu	BioRad
5 \times Nucleic Acid Sample Loading Buffer	BioRad
dNTPs mix	Agilent Technologies
Primer JIMP4 (0,1 mM) 5'-TCGTCATATGGCGGCAAC	Sigma-Aldrich

Primer JIMP5 (0,1 mM) 5'-GATCCTCGAGTTATTTCACTTTGC	Sigma-Aldrich
Plazmid pET-16b-MsrB-PilB	
Restrikční endonukleázy XhoI a NdeI	New England Biolabs
Ampicilin (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich
LB Agar	Sigma-Aldrich
Molecular Biology Agarose	BioRad®
10000× GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotum
10000× Invitrogen SYB Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
Deionizovaná voda	
Lihová směs	Lachner
500 ml láhve	
skalpel	
50 ml plastové zkumavky	Sigma-Aldrich
1,5 ml plastové zkumavky	Eppendorf
0,5 ml plastové zkumavky	Eppendorf
Lihový kahan	
Sterilní plastové Petriho misky	Thermo scientific
Stojánky na zkumavky	
Špičky na pipety	Vertex
Lepicí páska	
Hřeben na gel	BioRad
Pasteurovy pipety	Sigma-Aldrich
Kádinky	
Erlenmayerova baňka	
Polystyrenový box s ledem	

Mutagenní PCR

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda, která využívá schopnosti DNA polymerasy dle templátu syntetizovat nové vlákno DNA. Díky PCR je možné zmnožit určitý úsek DNA. DNA polymerasa přidává nukleotidy pouze na již existující 3' konec a proto je závislá na přítomnosti primeru (krátký DNA oligonukleotid), z něhož vychází samotná syntéza DNA. Volbou primeru lze definovat specifický úsek DNA, který má být namnožen²¹. V první fázi dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi řetězci DNA, čímž vzniká jednovláknová DNA. V druhé fázi dochází k asociaci primerů, což jsou krátké řetězce DNA komplementární k vybranému úseku. Ve třetí fázi dochází k nasednutí DNA polymerasy na vzniklou dvouvláknovou DNA a samotné syntéze DNA z volného 3' konce. V každém cyklu dochází k dvojnásobnému zmnožení DNA, která se s dalšími cykly exponenciálně množí. Primery jsou z principu vždy dva, pro každé vlákno dvoušroubovice jeden (Obr. 10). Primery jsou charakterizovány teplotou nasednutí. Tato teplota souvisí se zastoupením C-G interakcí, čím vyšší je zastoupení těchto interakcí, tím vyšší je teplota nasednutí a interakce s templátem je specifitější²¹. Každá DNA polymerasa je charakterizována určitou chybovostí. Chybovost běžně používané *Taq* polymerasy je zhruba $1 \cdot 10^{-4}$ nukleotidů na jedno kolo reakce PCR²². Chybovost *Taq* DNA polymerasy lze ovlivnit přítomností manganatých iontů nebo nerovnovážným zastoupením deoxynukleotidů²³. Tato metoda je využívána pro přípravu knihoven DNA. Využití *Taq* DNA polymerasy má však nevýhodu, že je podstatně zvýšené zastoupení mutací bazí A a T oproti G a C, což může vést ke značné předpojatosti výsledných knihoven²⁴. Proto byla vyvinuta rekombinantní polymeráza, která tuto nevýhodu nemá. Metoda výše popsané mutagenní PCR vede k přípravě knihovny rekombinantní DNA enzymu MsrB.



Obr. 10: Schéma průběhu PCR. V prvním fázi dochází k denaturaci DNA. Po denaturaci dochází k asociaci primerů, což jsou krátké řetězce DNA komplementární k vybranému úseku. Poté DNA polymerasa syntetizuje PCR produkt²¹.



Obr. 11: Zobrazení interakce primerů JIMP4 a JIMP5 se sekvencí MsrB-PilB.

Primery obsahují restrikční místa pro RE XhoI a NdeI. V našem případě se syntetizuje tedy fragment o délce 467 bp, který je štěpen RE na výsledný insert o délce 459 bp s komplementárními konci, který je substrátem pro ligační reakci.

Provedení

Byla použita komerční souprava GeneMorph II Random Mutagenesis Kit. Pro mutagenní PCR byly do 0,5 ml plastové zkumavky pipetovány všechny složky z tabulky 1 v takovém pořadí, jako jsou uvedeny. DNA polymerasa byla přidána až jako poslední a celá reakční směs byla promíchána opatrným, opakovaným nasátím. Poté byly plastové zkumavky umístěny do PCR termobloku a byly nastaveny parametry PCR z tabulky 2. Bylo uzavřeno víko a lehce dotáhnuto tak, aby se vrchní plocha dotýkala plastových zkumavek, teplota víka byla nastavena na 105°C.

Složka	V/ μ l
pET-16b-MsrB-PilB DNA (14 ng/ μ l)	36
FS voda	6
Mutazyme II reaction buffer 10 \times	5
dNTPs mix (40 mM)	1
JIMP-4 primer (25 μ M)	1
JIMP-5 primer (25 μ M)	1
Mutazyme II polymerasa 2,5 U/ μ l	1

Tab. 1: Složení reakční směsi pro mutagenní PCR.

Teplota/°C	Čas/min	Počet opakování pro amplifikaci: 30 \times
95	2	
95	0,5	
60	0,5	
72	0,5	
72	10	
4	∞	

Tab. 2: Parametry pro mutagenní PCR.

Agarosová elektroforéza

Tato elektroforéza se používá pro zobrazení fragmentů nukleových kyselin, které v agarosovém gelu putují ke kladné elektrodě, neboť fragmenty jsou záporně nabitě kvůli zbytkům kyseliny fosforečné ve své struktuře. Ve zdroji stejnosměrného napětí se v gelu fragmenty rozseparují podle své délky. Existují dvě možnosti pro vizualizaci nukleových kyselin a jejich fragmentů v agarosovém gelu. První a nejvyužívanější je metoda, při níž je interakce dvoušroubovice DNA s barvivem spojena s výrazným vzrůstem fluorescence barviva. Klasickým příkladem tohoto barviva je ethidium bromid anebo jeho bezpečnější alternativa SYBR Safe či GelRed, které jsou nemutagenní a bezpečnější pro životní prostředí. Tyto barvy umožní detekovat DNA v agarosovém gelu. Další z možností je vizualizace pomocí fluorescenčně nebo radioaktivně značných primerů²¹.

Provedení

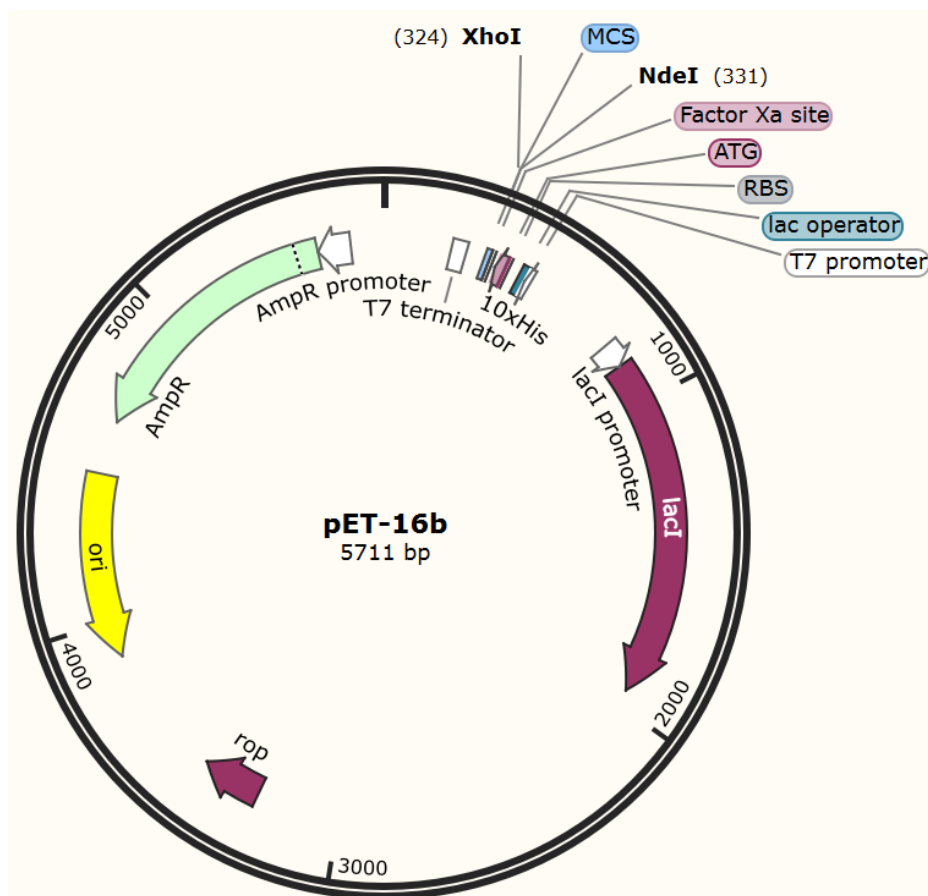
Pro průběh DNA elektroforézy bylo nejprve připraveno 50 ml 1% agarosového gelu. Bylo odváženo 0,5 g agarosy a převedeno do 100 ml Erlenmayerovy baňky. Poté bylo přidáno 50 ml 0,5× TBE pufru a suspenze byla přivedena k varu v mikrovlnné troubě. Rozpouštění bylo podpořeno krouživým mícháním. Po ochlazení roztoku na cca 50 °C bylo přidáno 2,5 µl 10 000× GelRed a promícháno. Tento roztok agarosy byl nalit do již připravené a vyvážené vaničky s hřebínkem. Po zchlazení byl gel s vaničkou vložen do nádoby na elektroforézu a přidán dostatečný objem 0,5× TBE pufru. Jako standardy byly použity komerční 100 bp nebo 1 kbp markery. Samotné vzorky byly nanášeny v aplikačním pufru v poměru 1:3 (vzorek : nanášecí pufr). Pro kvantifikaci DNA byl použit 1,1 kb standard o koncentraci 20 ng/µl. Po pipetování všech vzorků do jamek gelu byla vanička uzavřena víkem tak, aby kontakty na elektrodách doléhaly. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 mA po dobu 5-6 minut. Vizualizace gelů byla provedena pomocí UV transiluminátoru a následná kvantifikace DNA byla provedena pomocí softwaru ImageJ.

Restrikce plazmidu

Restrikční endonukleasy (RE) jsou enzymy, které rozeznávají vždy stejné sekvence v řetězci DNA a definovaně ho štěpí. RE katalyzují hydrolytické reakce. Bakterie se expresí těchto enzymů chrání proti infekci viry, které jsou schopné začlenit svojí DNA do genomu. V laboratorní praxi se staly RE nepostradatelným nástrojem pro přípravu rekombinantní DNA. RE rozeznávají sekvenci bazí, která jsou většinou palindromní (pořadí bazí je v obou vláknech stejné jenom zrcadlově obrácené proti sobě). Rozeznávaná sekvence je dlouhá 4-8 párů bazí. RE jsou typu I a typu II. RE typu II štěpí řetězec DNA přímo v rozpoznané sekvenci. RE typu I štěpí řetězec vždy nějak vzdálený od rozpoznané sekvence^{25,26}. Pro konstrukci plazmidové DNA s požadovaným insertem (genem pro MsrB) je nutná restrikce plazmidu vhodnými RE, do kterého může být zaklonován manipulovaný insert s mutacemi. Jako vektor byl použit plazmid pET16-b s MsrB-PilB doménou přirozené reduktasy.²⁷ Jako vhodné RE byly použity XhoI a NdeI, jejichž rozpoznávané sekvence a místa štěpení jsou znázorněna v obr. 12²⁸. Místa štěpení se nachází v úseku nazvaném MCS- „multiple cloning site“, kde jsou specifické sekvence, které rozeznávají restrikční endonukleázy a dokážou řetězec v tomto místě rozštěpit, tudíž vznikne lineární řetězec DNA.²⁶



Obr. 12: Místa štěpení dvoušroubovice DNA pomocí restrikčních endonukleas XhoI a NdeI. RE jsou typu II, štěpí přímo v rozpoznané sekvenci²⁹.



Obr. 13: Zobrazení vektorového plazmidu pET-16b s vyznačenými místy štěpení restričními endonukleázami XhoI a NdeI.

Provedení

Restrikcí byl podroben plazmid pET-16b-MsrB-PilB DNA s přirozenou reduktasou MsrB-PilB. Pro restrikcí byly použity komerční endonukleázy XhoI a NdeI od New England Biolabs. V 0,5 ml plastových zkumavkách byly namíchány 4 reakční směsi. Reakce 1 - kontrolní, bez obou RE, reakce 2 - s XhoI, reakce 3 - s NdeI a reakce 4 - s oběma RE. Složky reakční směsi byly pipetovány dle tabulky 3, v pořadí, v jakém jsou uvedeny, tedy jako poslední byly pipetovány do reakční směsi restriční endonukleasy. Po pipetování poslední složky byla automatická pipeta nastavena zhruba na objem 30 μ l a reakční směs byla pomalu propipetována, aby se promíchala. Následně byly plastové zkumavky umístěny do PCR termobloku při 37 °C po dobu 2 hodin a inaktivovány 20 min při 65°C.

	Reakce 1	Reakce 2	Reakce 3	Reakce 4
Složka	Objem V/ μ l			
FS voda	17,5	16,5	16,5	15,5
CutSmart pufr 10 \times	2,5	2,5	2,5	2,5
pET-16b-MsrB-PilB DNA (12 ng/ μ l)	5	5	5	5
Enzym XhoI 20 U/ml	0	1	0	1
Enzym NdeI 20 U/ml		0	1	1

Tab. 3: Tabulka složení reakční směsi pro štěpení plazmidové DNA pomocí restrikčních endonukleas XhoI a NdeI.

Izolace insert a vektor DNA z gelu

Pro izolaci byla využita komerční soustava E.Z.N.A Gel Extraction Kit. Po elektroforéze na agarosovém gelu s širokým hřebínkem byl gel barven v lázni SYBR Safe (150ml 1 \times TBE + 15 μ l 10000 \times SYBR Safe) po dobu 30 min v temnu. Tento postup umožňuje vizualizaci DNA pomocí modrého světla, a tak zabraňuje degradaci DNA při výřezu z gelu, která může nastat při standartním barvení a vizualizaci pomocí UV záření. Postup je zejména preferován při přípravě DNA knihoven, při němž je kladen důraz na vysokou efektivitu transformace, která může být snížena právě v důsledku tvorby thyminových dimerů při expozici UV záření. Následně byl gel v daném místě vyříznut na prosvěcovacím pultu s modrým světlem, za pomoci oranžových brýlí a výřezy byly přemístěny do předem zvážené plastové 1,5 ml plastové zkumavky. Poté byla zkumavka s gelem zvážena a byl přidán na každý 1 mg gelu, 1 μ l „binding“ pufru. Zkumavky byly inkubovány v třepačce při 60 °C a frekvenci třepání 250 RPM. Po kompletním rozpuštění gelu bylo změřeno pH směsi a upraveno přidávkem 3M (pH=5,2) acetátového pufru, tak aby pH indikátor v pufru B indikoval optimální pH lehce žlutým zbarvením. Poté byla směs rozdělena do dvou zkompletovaných kolonek se zkumavkou pro izolaci DNA. Následně byly zkumavky centrifugovány 1 min. při 10000 \times g a pokojové teplotě. Po odsátí prošlého roztoku přes kolonu pipetou bylo přidáno 300 μ l „binding“ pufru a centrifugováno při 13000 \times g. Následně bylo přidáno 700 μ l „wash“ pufru a centrifugováno při maximální rychlosti otáčení 16 900 \times g. Promytí bylo ještě jednou opakováno za stejných podmínek. Po promytí byla centrifugována prázdná kolona pro odstranění zbytku roztoků z kolony opět při maximální rychlosti otáčení 16 900 \times g.

Následně byla kolona přemístěna do prázdné plastové zkumavky a bylo přidáno 30 μl „elution“ pufru. Po krátké inkubaci za pokojové teploty byly zkumavky centrifugovány 1 min při $5000 \times g$. Takto byly získány izolované fragmenty DNA pro následující ligační reakci.

Restrikce insertu

Po mutagenní PCR byl získán fragment o délce 467 bp, který byl izolován z gelu. Pro získání insertu o délce 459 bp k následné ligační reakci bylo nutné i tento fragment štěpit pomocí RE. V 0,5 ml plastové zkumavce byla namíchána reakční směs dle tabulky 4 tedy jako poslední byly pipetovány do reakční směsi restrikční endonukleasy. Po pipetování poslední složky byla automatická pipeta nastavena zhruba na objem 30 μl a reakční směs byla pomalu propipetována, aby se promíchala. Následně byly plastové zkumavky umístěny do PCR termobloku při 37 °C po dobu 2 hodin a inaktivovány 20 min při 65 °C.

Složka	Objem V/ μl
FS voda	26
CutSmart pufr 10 \times	5
Purifikovaný DNA fragment po mutagenní PCR (23 ng/ μl)	17
Enzym XhoI 20 U/ml	1
Enzym NdeI 20 U/ml	1

Tab. 4: Složení reakční směsi pro štěpení fragmentu DNA po mutagenní PCR.

Ligace insertu do vektoru

DNA ligasa je enzym katalyzující vznik fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy. Štěpením produktu po mutagenní PCR pomocí RE byl získán fragment, označovaný jako insert. Tento fragment je ligován do vektoru, který vznikl štěpením plazmidové DNA (pET-16b-MsrB-PilB DNA) pomocí RE. Ligační reakci dojde ke spojení těchto dvou fragmentů s komplementárními konci a vytvoření kruhové plazmidové DNA³⁰.

Provedení

Pro ligaci byla použita T4 DNA ligasa od New England Biolabs. Pro reakci o celkovém objemu 20 μl bylo použito 15 μl insert DNA o koncentraci 1,5 ng/ μl a 3 μl vektor DNA o koncentraci 10 ng/ μl . Dále byly přidány 2 μl T4 DNA „ligase“ pufru (10 \times)

a nakonec 1 μ l T4 DNA ligasy. Vše bylo pipetováno do 0,5 ml plastové zkumavky a promícháno propipetováním. Reakce byla ponechána v PCR termobloku při 16 °C po dobu 16 h. Poté byla ligační reakce inaktivována zahřátím na 65 °C po dobu 10 min v PCR termobloku. Takto byly získány dvě reakční směsi. V první byla přítomna T4 DNA ligasa spolu s vektor DNA a insert DNA, takže je očekáváno, že plazmid byl spojen do kruhové molekuly schopné úspěšné transformace do kompetentních buněk. V druhé kontrolní směsi nebyl enzym. Tyto směsi byly poté využity při transformaci.

Příprava LB agarových ploten

Ztužené LB médium agarem se využívá pro kultivaci mikroorganismů. Na plotně s výživným médiem vznikají z mikrobiálních buněk kolonie. Je předpokládáno, že z jedné životaschopné buňky vznikne jedna ohraničená kolonie.

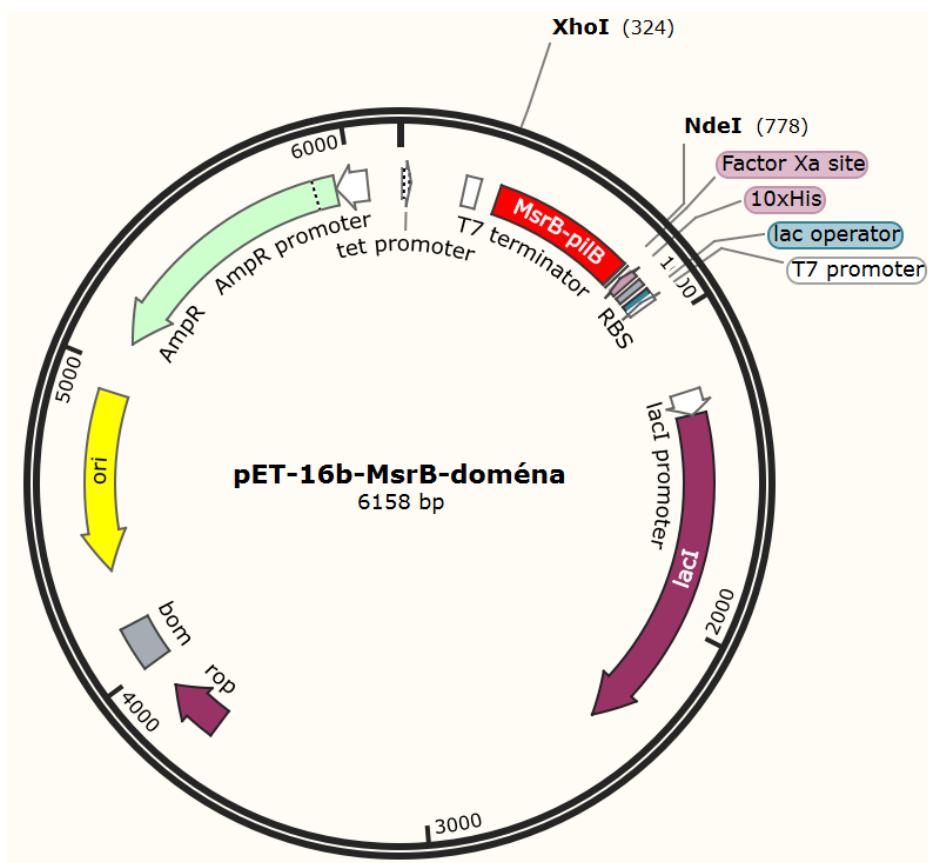
Provedení

K přípravě bylo použito práškové médium LB s agarem. Nejprve bylo odváženo 8 g tohoto média a rozpuštěno ve 400 ml deionizované vody. Následně byla láhev s mírně povoleným víčkem vložena do mikrovlnného autoklávu a ponechána vysterilizovat. Po sterilizaci byla láhev dotažena a ponechána ochladit. Při teplotě cca 50 °C bylo přidáno 400 μ l zásobního roztoku ampicilinu (100 mg/ml). Následně byla kapalina asepticky nalita na připravené sterilní Petriho misky, tak aby v každé misce bylo cca 20 ml. Ihned po nalití bylo víčko uzavřeno a misky byly ponechány zatuhnout. Plotny byly skladovány v lednici při 4 °C.

Transformace chemicky kompetentních buněk

Bakteriální transformace je proces, při kterém bakterie může přijmout cizí DNA. Tato DNA musí být ve formě plazmidu, tedy kruhové dvoušroubovice DNA. Každý plazmid, který je transformován do kompetentních buněk musí při nejmenším obsahovat alespoň 3 základní úseky. První z nich je sekvence umožňující replikaci plazmidu tzv. replikační počátek. Druhý úsek kóduje enzym zodpovědný za antibiotickou rezistenci. Antibiotikum v kultivačním prostředí slouží jako selekční marker v jehož přítomnosti jsou životaschopné pouze ty bakterie, které přijaly plazmid a získaly tudíž rezistenci na přítomné antibiotikum. Třetí nezbytný úsek je úsek „multiple cloning site“ obsahující místa štěpení pro restriční endonukleasy, kam může být vložen DNA fragment (na obr. 14 označeno jako MCS). Dále může plazmid obsahovat lac operator či histidinovou kotvu. Lac operátor je regulátor exprese, který může být indukován přidavkem derivátu

laktosy IPTG, který interaguje s lac inhibítor a spouští expresi²⁶. Histidinová kotva je kódována sekvencí nukleotidů, které vnáší do sekvence rekombinantního proteinu sekvenci několika histidinů za sebou, které poté mohou interagovat s afinitními nosiči pro proces izolace proteinu³¹. Kompetentní buňky jsou buňky, které jsou připraveny pro příjem exogenní DNA z prostředí. Bakterie mohou přijmout plazmid jak přírodní kompeticí, tak mohou být připravena uměle kompetentní bakteriální buňky, které po ošetření chemikáliemi a následným tepelným šokem, které následně přijmou plazmid. Kompetentní buňky se připravují ošetřením vyšší koncentrací Ca^{2+} iontů, což změní elektrochemický potenciál cytoplazmatické membrány. Tepelným šokem se změní propustnost membrány a buňka může přijmout molekuly plazmidu. Další možnost transformace je využití elektrokompetentních buněk, které přijmou plazmid na základě poklesu elektrické vodivosti cytoplazmatické membrány a poklesu její permeability³².



Obr. 14: Zobrazení plazmidu se zaklonovanou doménou pro MsrB z pilB.

Takovýto plazmid je připraven pro transformaci kompetentními buňkami.

Provedení

Ligační směsi z předešlého kroku byly použity pro transformaci chemicky kompetentních bakterií *E.coli*. Byly použity komerčně dodávané kompetentní buňky *E.coli* XL10-Gold. Nejprve bylo předeřháto LB médium v třepačce na 42 °C. 100 µl kompetentních buněk bylo ponecháno roztát na rozdrceném ledu. Následně byly buňky rozděleny na dva 50 µl alikvoty a ke každému bylo přidány 2 µl β-merkaptioethanolu. Buňky byly promíchány opakovaným nasátím a poté inkubovány na ledu po dobu 10 minut s občasným promícháním. Poté byly přidány 2 µl ligační směsi ke každému 50 µl alikvotu kompetentních buněk. Lehkým poklepáním byla zkumavka promíchána a ponechána na 30 minut inkubovat na ledu. Po inkubaci byla zkumavka ponořena přesně na 30 sekund do třepačky, která měla v bloku vytemperovanou vodu na 42 °C. Následovala inkubace na ledu po dobu 2 minut. Poté bylo do každé zkumavky s kompetentními buňkami přidáno 450 µl předeřhátého LB media na 42 °C. Směs byla ponechána třepat po dobu 1 hodiny v třepačce s frekvencí 250 RPM. Suspenze byla aplikována na plotny s LB Amp agarem a rozetřena ohnutou Pasteurovo pipetou. Plotny byly ponechány v inkubátoru přes noc při teplotě 37 °C se zavěšeným agarem.

Izolace DNA z buněk

Pro izolaci plazmidové DNA byly vyvinuty komerční soupravy. Tyto soupravy zpravidla obsahují kolonu, na které se adsorbuje DNA. Nejprve je bakteriální kultura, ze které chceme DNA izolovat lyzována, aby došlo k vylití cytosolu. Následně je tento lyzát aplikován na kolonu, která je součástí soupravy. Na této koloně je přítomen povrch, na kterém se adsorbuje izolovaná DNA. Při aplikaci odstředivého zrychlení dojde k filtraci roztoku přes kolonu do sběrné zkumavky a k adsorpci izolované plazmidové DNA. Adsorbovaná DNA může být dále promyta. Pro eluci je na kolonu aplikován pufr, který intereaguje s povrchem kolony silněji než izolovaná DNA a dojde k uvolnění do roztoku³³.

Provedení

Z narostlé plotny byla sterilní špičkou odebrána kolonie a špička byla ponořena do 5 ml LB Amp media v 50 ml sterilních plastových zkumavkách. Tato směs byla inkubována po dobu 8 hodin, při 37 °C a 200 RPM v třepačce. Pro samotnou izolaci plazmidové DNA z buněk byla použita komerční souprava Aurum Plasmid Mini Kit od Bio-Rad. Do 1,5 ml plastové zkumavky byl převeden 1 ml buněčné kultury buněk v LB mediu. Tato suspenze byla centrifugována po dobu 10 min při $10\,000 \times g$ a vzniklý

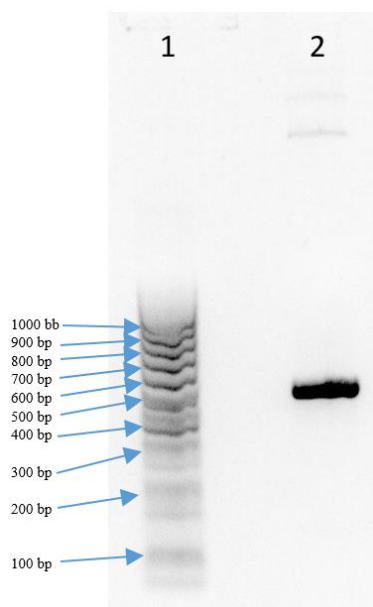
supernatant byl odsát pipetou. Tento proces byl opakován až do získání pelety buněk odpovídající celé 5 ml kultuře. Peleta byla následně resuspendována v 250 μ l „resuspension“ roztoku. Poté bylo přidáno 250 μ l „lysis“ roztoku a uzavřená zkumavka byla několikrát převrácena k promíchání jednotlivých složek směsi. Následně bylo přidáno 350 μ l „neutralization“ roztoku a zkumavka byla opět několikrát převrácena. Poté byla zkumavka centrifugována po dobu 5 minut při $16\,900 \times g$. Supernatant byl opatrně pipetou odebrán a převeden do kolony se sběrnou zkumavkou. Kolona byla centrifugována 1 min při $16\,900 \times g$. Následně byla kolona promyta 750 μ l „wash“ roztoku a centrifugována za stejných podmínek. Po slití supernatantu se sběrné zkumavky byla kolona centrifugována ještě jednou za stejných podmínek. Dále byla kolona umístěna do nové plastové zkumavky a bylo nanášeno 50 μ l „elution“ roztoku. Kolona byla ponechána cca 1 min při pokojové teplotě a následně centrifugována 1 min. Koncentrace eluované DNA byla určena spektrofotometricky na přístroji Biodrop pomocí software BioDrop Resolution a metody „dsDNA“. Takto izolovaná DNA byla odeslána na sekvenaci.

Výsledky

Celá příprava mutantů enzymu MsrB byla kontrolována pomocí agarosové elektroforézy.

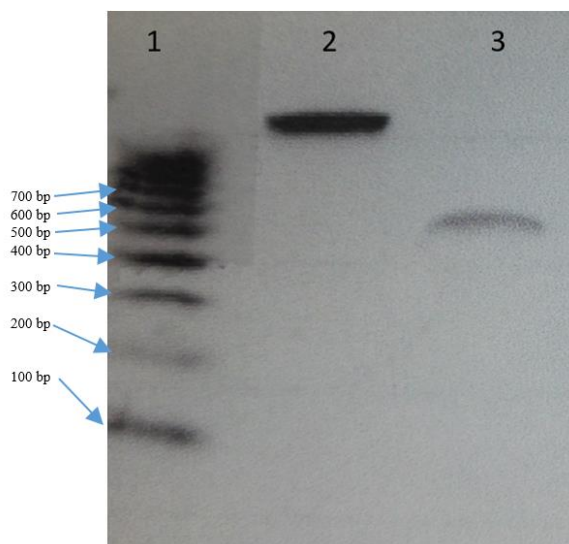
Pro zmnožení genu MsrB pomocí mutagenní PCR byl použit jako templát plazmid pET-16b-MsrB-PilB s přirozenou verzí MsrB, který byl připraven v laboratoři již dříve. Po 30 cyklech PCR byl průběh reakce zkontrolován pomocí agarosové elektroforézy.

Žádaný produkt má velikost 467 párů bazí. Na agarosovém gelu byl skutečně viditelný pás odpovídající tomuto produktu, společně s pásem odpovídajícímu plazmidovému templátu.



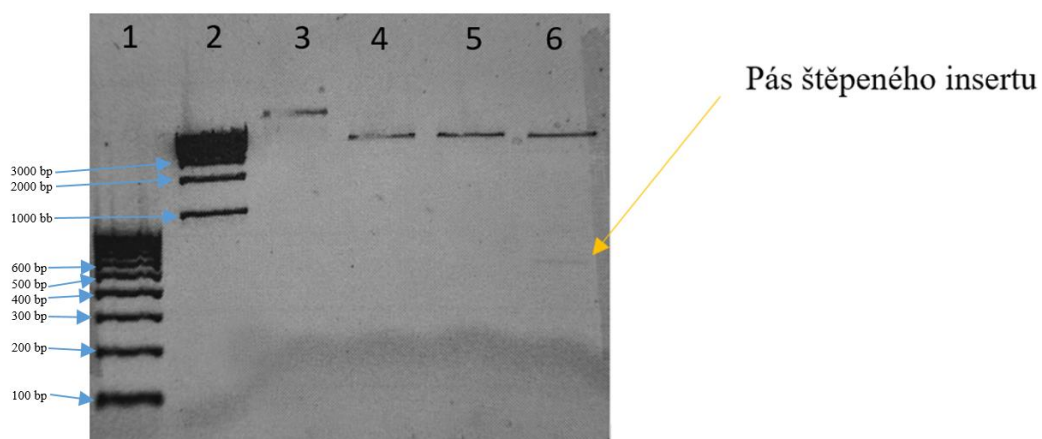
Obr. 15: Agarosová elektroforéza mutagenní PCR. Dráha 1-marker 100 bp; dráha 2- mutagenní PCR

PCR produkt byl následně izolován z gelů pomocí komerční soupravy a koncentrace takto získané DNA byla stanovena jak spektrofotomertricky, tak porovnáním se standardem v agarosovém gelu (obr. 16).



Obr. 16: Agarosová elektroforéza PCR produktu po jeho izolaci z gelu. Dráha 1- marker 100 pb; 2- 1,1 kbp standard; 3- izolovaný PCR produkt

Dále bylo provedeno štěpení plazmidu pET-16b-MsrB-PilB pomocí restrikčních endonukleas XhoI a NdeI. Výsledek těchto experimentů je opět analyzován agarosovou elektroforézou (obr. 17).

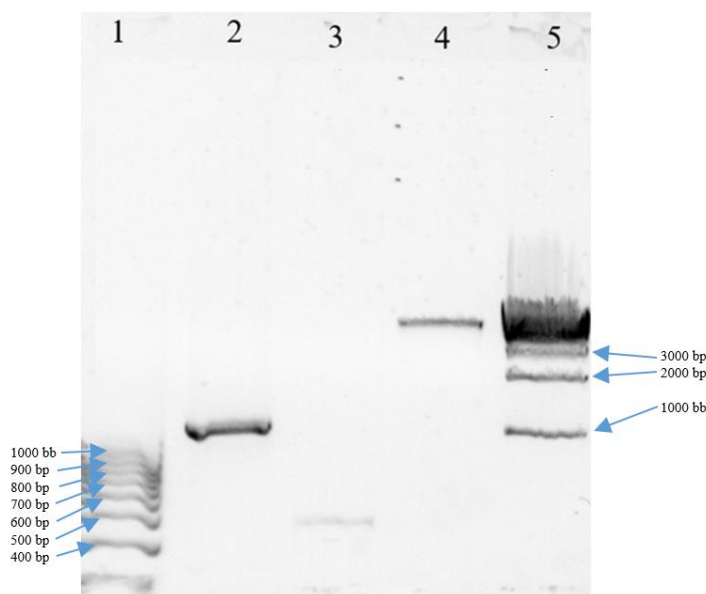


Obr. 17: Agarosová elektroforéza restrikce plazmidu Pet-16B-MsrB-PilB. Dráha 1- marker 100 pb, 2- marker 1 kbp; 3- reakce bez RE; 4- reakce pouze s XhoI, 5- reakce pouze s NdeI, 6- reakce s oběma RE

Jak je patrné z obr. 17 restrikcí plazmidu jednotlivými RE vedlo, v porovnání s kontrolní dráhou 3, ke změně mobility produktů na agarosovém gelu při elektroforéze. Restrikce plazmidu s oběma RE vedlo dle očekávání též ke změně mobility produktů.

Navíc je v dráze 6 patrný pás odpovídající insertu MsrB, což potvrzuje úspěšnost restrikce plazmidu pET-16b-MsrB-PilB. Současně s restrikcí plazmidu byla provedena i restrikce insertu z mutagenní PCR. Oba produkty restrikce byly izolovány z agarosového gelu pomocí komerční soupravy. Koncentrace byla opět určena spektrofotometricky.

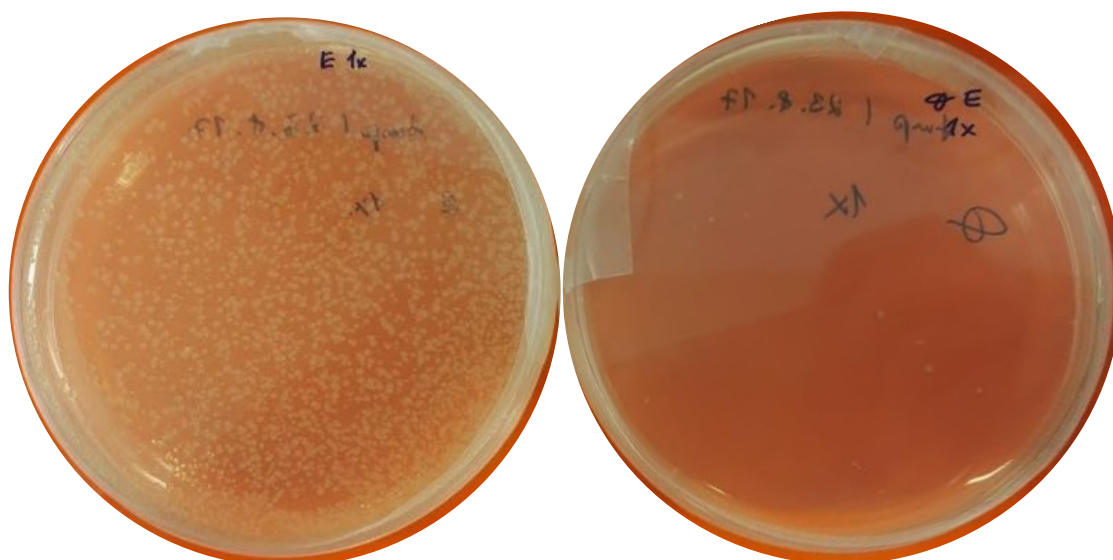
Takto připravený vektor a insert vzniklý mutagenní PCR byly podrobeny ligační reakci s použitím T4 DNA ligasy. Před touto ligační reakcí byla provedena agarosová elektroforéza samotných vzorků insertu a vektoru. Jako kontrola byla použita směs bez přítomnosti ligasy.



Obr. 18: Zobrazení lineárních úseků insertu a vektoru před ligační reakcí.

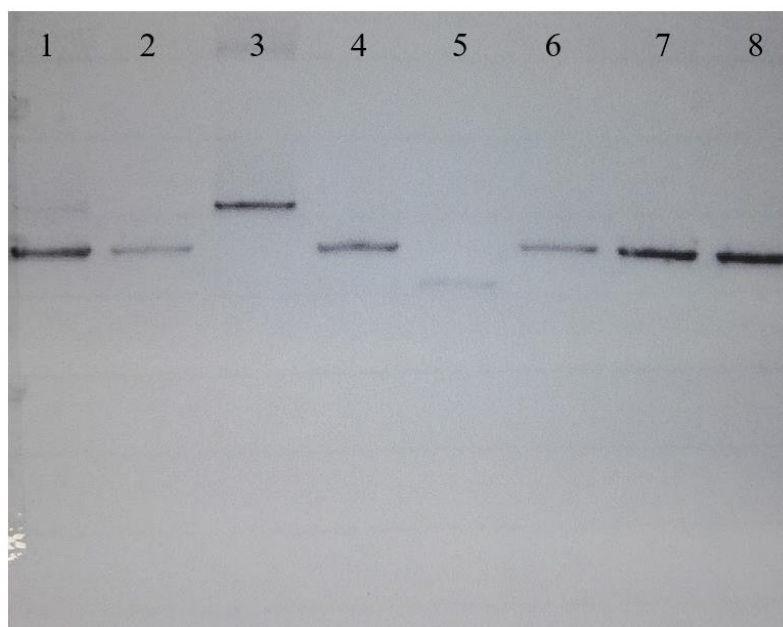
Dráha 1- marker 100 pb; 2- 1,1 kb standard 50 ng; 3- insert; 4-vektor; 5-marker 1 kbp

Po ligační reakce byly jednotlivé směsi transformovány do kompetentních buněk. Vektor pET-16b obsahuje gen pro rezistenci na ampicilin, čehož je využíváno jako selekčního markeru. Z obr. 19 je patrná úspěšnost ligační reakce. Na LB-Amp-agar plotnách s použitou ligační reakcí vyrostlo cca 1200 kolonií. Kontrolní reakce bez T4 DNA ligasy neposkytla téměř žádné kolonie.



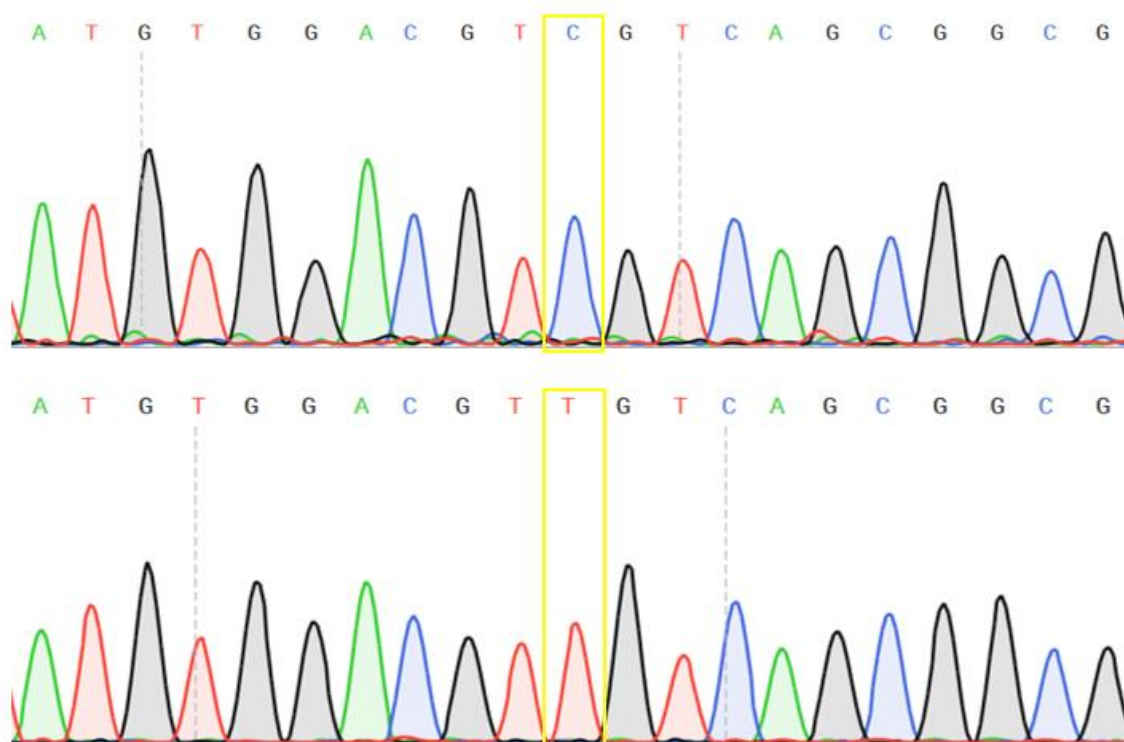
Obr. 19: LB-Amp-agar plotny inokulované kompetentními buňkami transformovanými ligační reakcí a kontrolou. Vlevo je plotna inokulovaná směsí z transformace, ve které byla použita T4 DNA ligasa. Vpravo je plotna inokulovaná směsí z transformace kontrolní reakce.

Z ploten bylo vybráno deset kolonií a jejich plazmidová DNA byla izolována dle postupu popsáném výše. DNA byla sekvenována v Laboratoři sekvenace na PřF UK.



Obr. 20: Agarosová elektroforéza vybraných vzorků izolované DNA jednotlivých klonů. Dráha 1- kontrolní plazmid, 2-8 klon 1-7.

Jasně čitelné sekvence byly získány pro 7 mutantů. Všechny tyto mutanty obsahovaly ve svojí sekvenci alespoň jednu mutaci oproti přirozenému genu MsrB. U zbylých 3 klonů nedošlo k získání kompletní sekvence, nebo nešly sekvenovat vůbec. Počet a druh mutací byl vyhodnocen pomocí webového nástroje Clustal Omega. Po porovnání se sekvencí přirozenou MsrB byly zjištěny v každé analyzovatelné sekvenci mutace.



Obr. 21: Příklad vyhodnocení sekvenačních chromatogramů. Vrchní chromatogram je sekvence přirozené MsrB, kdežto spodní chromatogram sekvence mutantu. V klonu došlo k záměně C→T na pozici na pozici 153.

Druh a četnost zjištěných mutací je přehledně zobrazena v tabulce 5.

Typ záměny	Klon č.							Procentuální četnost mutace
	1	2	3	4	5	6	7	
A→T	x				x			10 %
A→G						xxx		15 %
A→C								0 %
T→A	x							5 %
T→G			x					5 %
T→C								0 %
C→T							xx	10 %
C→A						x	x	10 %
C→G								0 %
G→A	x	x	x	x	x			25 %
G→T	xx				x			15 %
G→C							x	5 %
Celkový počet na mutanta	5	1	2	1	3	4	4	
Součet mutací	20							
Průměrný počet mutací na jednoho mutanta	2,9							

Tab. 5: Zastoupení mutací v klonech enzymu MsrB.

Z tab. 5 vyplývá, že zastoupení mutací v mutantech je poměrně náhodné, to znamená, že výrazně nepřevládá u žádného z nukleotidů jenom jeden typ záměny.

Diskuze

Cílem práce byla příprava knihovny klonů enzymu MsrB s náhodnými mutacemi v sekvenci a určení charakteru těchto mutací. Tato knihovna bude následně použita pro selekci klonů s výrazně zvýšenou aktivitou oproti přirozené reduktase. Klony se zvýšenou aktivitou mohou být velmi užitečnými biokatalyzátory pro asymetrickou přípravu chirálních sulfoxidů. V laboratoři školitele byly testovány tři přirozené MsrB s nejvyššími publikovanými katalytickými aktivitami^{34,35}. MsrB-PilB z *Neisseria gonorrhoeae*, MsrB z *Thermococcus kodakaraensis* a lidská hCBS-1 MsrB. MsrB-PilB z *Neisseria gonorrhoeae* byla vybrána kvůli nejvyšší enzymatické aktivitě.

Jako klíčový krok pro přípravu knihovny klonů MsrB s náhodnými sekvencemi byla použita mutagenní PCR. Bylo využito komerční soupravy GeneMorph II. Záměrem práce bylo získání knihovny s 2-4 náhodnými mutacemi na klon. Bylo předpokládáno, že tato úroveň mutací nebude výrazně ovlivňovat celkovou strukturu proteinu. Nicméně bude poskytovat dostatečnou diverzitu pro potenciální získání zvýšené enzymové aktivity. Dle těchto požadavků byly nastaveny vstupní podmínky pro mutagenní PCR. Počet mutací při mutagenní PCR je dán počtem cyklů. Dle protokolu ke komerční soupravě GeneMorph II bylo nejprve testováno 8 cyklů, které by měly poskytovat požadovanou frekvenci mutací. Nicméně použitím těchto podmínek neposkytlo žádné mutace, jak bylo zjištěno sekvenací deseti náhodných klonů. Zvýšením cyklů PCR na 15 poskytlo detekovatelné mutace, avšak s nízkou frekvencí. Až při použití 30 cyklů byla získána požadovaná frekvence mutací. Tento výsledek ukazuje, že mutagenní PCR za použití komerční soupravy vyžaduje důkladnou optimalizaci a nelze se spolehnout pouze na publikovaný protokol.

Sekvenací DNA byla určena frekvence a charakter mutací. Použitím komerční soupravy bylo dosaženo náhodného zastoupení mutací v klonech. Použití samotné *Taq* polymerasy by vedlo ke zkreslení výsledné knihovny rekombinantní DNA, neboť by pravděpodobně nebylo dosaženo dostatečně rovnoměrného zastoupení všech druhů mutací.

Závěr

Byla získána knihovna mutantů enzymu methioninsulfoxidreduktasy B z organismu *Neisseria gonorrhoeae* (pilB) a určena míry a charakteru mutací. Knihovna mutantů byla získána zanesením náhodných mutací do sekvence přirozené MsrB, přípravou rekombinantní DNA, transformace kompetentních buněk a následnou sekvenací. Bylo zjištěno, že pro získání mutantů je nutné, aby proběhlo optimálně 30 cyklů mutagenní PCR. Tyto knihovny budou dále pro získání enzymu využitelného při enantioselektivní syntéze chirálních sulfoxidů.

Seznam zdrojů

1. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
2. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2002).
3. Straathof, A. J. J. & Adlercreutz, P. *Applied Biocatalysis*. (CRC Press, 2000).
4. Choy, M. & Lam, S. Sitagliptin: a novel drug for the treatment of type 2 diabetes. *Cardiol. Rev.* **15**, 264–271 (2007).
5. Savile, C. K. *et al.* Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* **329**, 305–309 (2010).
6. Han, J., Soloshonok, V. A., Klika, K. D., Drabowicz, J. & Wzorek, A. Chiral sulfoxides: advances in asymmetric synthesis and problems with the accurate determination of the stereochemical outcome. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 1307–1350 (2018).
7. McMurry, J. *Organická chemie*.
8. Toru, T. & Bolm, C. *Organosulfur Chemistry in Asymmetric Synthesis*.
9. Li, J. *et al.* Pharmacokinetic properties of esomeprazole in adolescent patients aged 12 to 17 years with symptoms of gastroesophageal reflux disease: A randomized, open-label study. *Clin. Ther.* **28**, 419–427 (2006).
10. Blaser, H. U. & Schmidt, E. *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions, 2nd Edition*.
11. Engber, Dennis & Koury. Differential patterns of regional c-Fos induction in the rat brain by amphetamine and the novel wakefulness-promoting agent modafinil. *Neurosci. Lett.* **241**, 95–98 (1998).

12. Ang, E. L. *et al.* Biocatalysts and methods for the synthesis of armodafinil. (2017).
Levine, R. L., Moskovitz, J. & Stadtman, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* **50**, 301–307 (2000).
13. Levine, R. L., Moskovitz, J. & Stadtman, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* **50**, 301–307 (2000).
14. Makukhin, N., Tretyachenko, V., Moskovitz, J. & Míšek, J. A Ratiometric Fluorescent Probe for Imaging of the Activity of Methionine Sulfoxide Reductase A in Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 12727–12730 (2016).
15. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, 9–19 (2012).
16. Shchedrina, V. A. *et al.* Overexpression of methionine-R-sulfoxide reductases has no influence on fruit fly aging. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 429–443 (2009).
17. Boschi-Muller, S. *et al.* A Sulfenic Acid Enzyme Intermediate Is Involved in the Catalytic Mechanism of Peptide Methionine Sulfoxide Reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 35908–35913 (2000).
18. Moskovitz, J. *et al.* Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12920–12925 (2001).
19. Weissbach, H. *et al.* Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Structure, Mechanism of Action, and Biological Function. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 172–178 (2002).
20. Garibyan, L. & Avashia, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.* **133**, e6 (2013).

21. Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. Mutagenic PCR. *Genome Res.* **3**, S136–S140 (1994).
22. Abou-Nader, M. & Benedik, M. J. Rapid generation of random mutant libraries. *Bioeng. Bugs* **1**, 337–340 (2010).
23. Agilent Technologies. Instruction Manual-GeneMorph II Random Mutagenesis Kit.
24. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. Restriction Enzymes: Performing Highly Specific DNA-Cleavage Reactions. (2002).
25. Lodish, H. F. (2013). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman and Co.
26. H. Gunaratne, P., J. Creighton, C. & Watson, M. *Methods in Molecular Biology*.
27. Lodish, H. *et al.* *DNA Cloning with Plasmid Vectors*.
28. Types of Restriction Endonucleases | NEB. <https://www.neb.com/>
29. Gaastra, W. & Hansen, K. Ligation of DNA with T4 DNA Ligase. v *Nucleic Acids* 225–230
30. Hengen, P. N. Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 285–286 (1995).
31. Das, S. & Dash, H. R. *Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems*.
32. Birnboim, H. C. [17] A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. v *Methods in Enzymology* **100**, 243–255.
33. Fukushima, E., Shinka, Y., Fukui, T., Atomi, H. & Imanaka, T. Methionine Sulfoxide Reductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis*, an Enzyme Designed To Function at Suboptimal Growth Temperatures. *J. Bacteriol.* **189**, 7134–7144 (2007).

34. Jung, S., Hansel, A., Kasperczyk, H., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Activity, tissue distribution and site-directed mutagenesis of a human peptide methionine sulfoxide reductase of type B: hCBS1. *FEBS Lett.* **527**, 91–94 (2002).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka